

比较小檗碱对 HEPG2 蛋白质组的抗肿瘤作用*

陈 华,谷 容,赵晓东,刘 雯,袁拥华[△]

(重庆医科大学附属儿童医院药学部,重庆 400014)

摘要:目的 探讨小檗碱对人肝癌细胞株 HEPG2 蛋白表达的影响及其抗肿瘤作用的分子机制。方法 采用蛋白质组学技术比较小檗碱处理人肝癌细胞株 HEPG2 前、后蛋白表达的变化。结果 筛选出差异表达蛋白共 38 个,16 个蛋白表达上调,22 个蛋白表达下调,质谱鉴定出 10 个蛋白点。结论 小檗碱的抗肿瘤效应可能与过氧化物酶增殖物激活受体 γ (PPAR γ)信号转导通路有关,PPAR γ 可能是小檗碱的作用靶点。

关键词:小檗碱;蛋白质组学;抗肿瘤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.18.015

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)18-2303-02

Comparative proteomic study on antitumor effect of berberine on human hepatocellular carcinoma cell line HEPG2*

Chen Hua, Gu Rong, Zhao Xiaodong, Liu Wen, Yuan Yonghua[△]

(Department of Pharmacy, Affiliated Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To research the effects of berberine on the protein expression of human hepatocellular carcinoma cell line HEPG2 for elucidating its antitumor mechanism. **Methods** The change of protein expression of human hepatocellular carcinoma cell line HEPG2 induced by berberine were analyzed by using comparative proteomics. **Results** A total of 38 differentially expressed protein spots were detected. 16 protein spots were up-regulated and 22 protein spots were down-regulated. 10 protein spots were successfully identified by the mass spectrum. **Conclusion** The berberine antitumor effect may be related with PPAR γ signal transduction pathway, PPAR γ may be the target of berberine.

Key words: berberine; proteomics; antitumor

小檗碱及黄连素(berberine),是从中药黄连中提取的一种季胺类化合物,具有抗病原微生物与免疫调节、降血糖、降血脂、抗肿瘤、调节心血管系统、治疗精神疾患等多种药理作用。近年来国内外不断有临床和实验研究证实,小檗碱还具有明显的抗肿瘤作用,对肝癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、食管癌、脑部肿瘤和膀胱癌等许多肿瘤细胞的生长、增殖都有抑制作用。但迄今为止,小檗碱抗肿瘤作用的机制还不清楚,虽有报道认为这种作用与小檗碱抑制拓扑异构酶或端粒酶的作用有关(包括抑制细胞因子以及调控细胞周期等),但这些“机制”仅仅停留于表象的研究^[1-4]。为此,本研究拟以人肝癌细胞株 HEPG2 为模型,通过比较小檗碱给药前、后的人肝癌细胞株 HEPG2 蛋白质组的差异,对其抗肿瘤作用机制进行探讨。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器 小檗碱购自中国药品生物制品鉴定所;固相 pH 梯度胶条(IPG 干胶条, pH4-8,非线性)购自美国 Bio-Rad 公司,蛋白酶抑制剂、二硫苏糖醇(DTT)、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、三羟甲基氨基甲烷(Tris)购自美国 Sigma 公司,胰蛋白酶购自 Promega 公司;等电聚焦仪(Protein IEF cell)、垂直电泳槽(Protein II XI cell)及 PDQuest7.4.0 图像分析软件为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 细胞蛋白质制备 取对数生长期 HEPG2 细胞,用含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小檗碱处理 72 h 后,倾去培养基,用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 洗涤 3 次,吸净 PBS,加入细胞裂解液[7 mol/L 尿素+2 mol/L 硫脲+4% CHAPS+40 mol/L Tris+1% DTT+2% 两性电解质(pH3-10)+蛋白酶抑制剂混合物],用细胞刮匙刮取

并收集细胞裂解液,14 000 \times g 离心 15 min,取少量上清液采用 Bradford 法测定总蛋白质的浓度。

1.2.2 双向电泳及图像分析 取等量对照组和加药组蛋白,按 Bio-Rad 公司的 2-DE 操作指南进行双向电泳,采用考马斯亮蓝染色法进行染色。图像经扫描后,用 PDQuest 7.4.0 软件对图像进行平滑处理、背景消减、斑点检测、匹配。将对照组和给药组凝胶图像的蛋白点自动检测后进行均一化处理,建立定量比较分析组。

1.2.3 差异蛋白点的鉴定 选择 2 倍以上表达差异的蛋白质点,胶内酶解^[5]。用美国 ABI 公司的 Voyager DE-PROMAL-DI-TOF 质谱仪分析。选择 Prospector 网站提供的搜索引擎 MS-Fit 进行查询。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 蛋白质表达变化 对照组细胞检测到(1 026 \pm 28)个蛋白点,给药组细胞检测到(1 058 \pm 32)个蛋白点。每组试验平行进行了 3 次,采用不对称 t 检验进行统计分析,发现 16 个匹配的蛋白点表达显著增加,22 个蛋白点表达显著降低($P < 0.05$)。图 1 是小檗碱给药后人肝癌细胞 HEPG2 的典型双向电泳图谱。用 PDQuest7.4.0 软件对蛋白图谱进行比较分析,显示 2-DE 图谱匹配率达(78 \pm 6.5)%($n=3$),其中 38 个匹配的蛋白点存在表达量上的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 蛋白质鉴定 经 MS-Fit 查询 SwissProt 数据库,结合 2-DE 凝胶上蛋白点的分子量和等电点,初步鉴定出其中 10 个蛋白点(表 1),他们分别是过氧化物酶增殖物激活受体

(PPARs)、环氧酶-2(COX-2)、低密度脂蛋白受体(LDLR)、热休克蛋白 90(HSP90)、果糖二磷酸缩酶(Fbal)、硫氧还蛋白过氧化物酶(TPx)、醛糖还原酶(AR)、脂蛋白脂肪酶(LPL)、脂肪酸结合蛋白(FABP)、脂肪酸转运蛋白(FATP)。

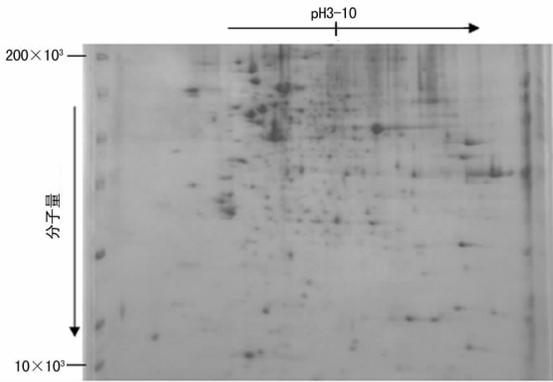


图 1 4 μg/mL 小檗碱处理后 HEPG2 细胞的双向电泳图谱

表 1 小檗碱处理前后 HEPG2 细胞的差异表达蛋白质鉴定结果

蛋白点	蛋白质名称	检索覆盖率(%)	比值(处理前/后)
1	FABP	66.1	0.29
2	COX-2	33.1	0.38
3	Fbal	47.4	0.43
4	TPx	75.9	0.45
5	FATP	57.3	0.48
6	PPARs	20.7	2.40
7	HSP90	37.2	2.59
8	LDLR	10.3	2.60
9	LPL	42.1	2.71
10	AR	27.0	3.24

3 讨论

蛋白质组学是全景式研究蛋白质网络及其动态变化的一门新兴科学,是从整体的角度研究生物机体、组织、细胞甚至细胞器基因编码的全部蛋白质,包括蛋白的组成、种类、分布、功能、代谢特征及其动态变化规律等^[5-7]。由于蛋白质是生命活动和生物结构最主要的实际承担者,从整体水平出发的蛋白质组学研究可在更贴近生命本质的层次上去发现和了解生命活动的规律。研究表明,大约仅有 2% 的疾病与基因序列有关,约 98% 的疾病与蛋白质的表达有关,药物的作用机制都直接或间接与蛋白质相关。因此,蛋白质组学在药物研究中具有重要意义。通过比较药用活性化合物处理(治疗)前后,模型细胞或组织的蛋白质组的表达差异并鉴定发生了相应变化的蛋白质,可揭示药物的作用机理,发现新的药靶蛋白和进行药物的毒理学研究。

本研究以人肝癌细胞株 HEPG2 为模型,通过比较小檗碱给药前后的细胞蛋白质组差异,初步找到了小檗碱抗肿瘤作用的差异蛋白。

PPARs 是一组具有多种功能的核受体超家族成员,属配体依赖的核转录因子,PPARs 存在着 3 种亚型: PPAR α 、PPAR β 、PPAR γ ,其中 PPAR γ 不仅在能量、糖类、脂类代谢等

方面发挥重要作用,还能诱导多种肿瘤细胞分化、促进凋亡,其配体主要包括人工合成配体和天然配体两类^[8-11]。PPAR γ 可与 DNA 结合伴侣维 A 酸 X 受体(RXR)结合形成二聚体,同时募集转录共激活子 PPAR 结合蛋白,直接识别并与靶基因启动子的 PPAR 反应元件(PPRE)结合,调节相关基因转录,包括 FABP 和磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶以及促脂肪生成蛋白:脂肪酸转运蛋白、脂蛋白脂肪酶等。有报道 PPAR γ 被激活后可能主要通过以下途径抑制肿瘤血管生成:(1)抑制内皮细胞增殖和分化为管样结构;(2)激活 Caspase 诱导内皮细胞凋亡;(3)下调肿瘤组织血管内皮生长因子表达;(4)降低内皮细胞尿激酶型纤溶酶原激活因子表达,并增加 I 型纤溶酶原激活物抑制因子 I 表达,从而抑制血管基底膜降解^[2-3]。

COX-2 能够催化花生四烯酸转变为 PGH₂,PGH₂ 可转变为 PGD₂、PGE₂、PGF-a、PGI₂ 以及血栓素 A₂-系列类花生酸类物质。其中 PGE₂ 可以结合于转录因子 PPAR γ ,激活靶基因转录,促进肿瘤恶变过程;PGE₂ 还可增加 bcl-2 的表达,抑制细胞凋亡及参与肿瘤血管的形成。盐酸小檗碱可以通过降低细胞内 Ca²⁺ 浓度抑制 COX-2 mRNA 表达以及 COX-2 对花生四烯酸的催化活性,从而抑制 PGH₂ 的生成,发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用^[12]。

AR 在高血糖条件下被激活后可催化葡萄糖大量转化为不易透过细胞膜的山梨醇(一种多元醇),引起组织细胞渗透性损伤。此外,HSP 是机体最基本的生理功能之一,它可以保护机体免受环境变化或内外刺激带来的有害影响。

从以上鉴定的部分蛋白质初步表明,在小檗碱处理的 HEPG2 细胞中,细胞蛋白表达谱发生了相应的改变,其中大多数蛋白与 PPAR γ 信号转导途径有关,PPAR γ 可能是小檗碱抗肿瘤作用的靶点。

参考文献:

- [1] Letasiová S, Jantová S, Miko M, et al. Effect of berberine on proliferation, biosynthesis of macromolecules, cell cycle and induction of intercalation with DNA, dsDNA damage and apoptosis in Ehrlich ascites carcinoma cells [J]. J Pharm Pharmacol, 2006, 58(2): 263-270.
- [2] Swinnen JV, Heemers H, Van de Sande T, et al. Androgens, lipogenesis and prostate cancer [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2004, 92(4): 273-279.
- [3] Lin CC, Lin SY, Chung JG, et al. Down-regulation of cyclin B1 and up-regulation of Wee1 by berberine promotes entry of leukemia cells into the G₂/M-phase of the cell cycle [J]. Anticancer Res, 2006, 26(2A): 1097-1104.
- [4] Barreto MC, Pinto RE, Arrabaea JD, et al. Inhibition of mouse liver respiration by Chelidonium majus isoquinoline alkaloids [J]. Toxicol Lett, 2003, 146(1): 37-47.
- [5] 袁拥华, 李伟, 杨晓兰, 等. 人肝癌细胞株 QGY-7701 蛋白质组学研究技术及二维电泳图谱的建立 [J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(12): 1233-1236.
- [6] Kuhajda FP, Pizer ES, Li JN, et al. Synthesis and antitumor activity of an inhibitor of fatty acid synthase [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(7): 3450-3454.
- [7] Yang YA, Morin PJ, Han WF, et al. Regulation of fatty acid synthase expression in breast cancer by sterol regulatory element binding protein-1c [J]. Exp Cell Res, 2003, 282(2): 132-137.

CPP)。在后来的研究中,陆续发现了几种不同的 CPP,其中常用的穿膜多肽有 HIV-TAT 和多聚精氨酸,如 11R 和 9R。研究发现 CPP 在离体和整体实验中均有良好的穿膜效应,已成功应用于运输多种不同的生物活性分子,如蛋白、多肽、核酸、脂质体等进入细胞以进行治疗,这也被称为蛋白导入疗法^[11-13]。

在本研究中,作者最初是将 11R 与 GFP-PHD 融合,但在纯化 11R-GFP-PHD 时出现严重的重组蛋白聚集,故减少多聚精氨酸的个数,将 9R 与 GFP-PHD 融合。通过镍柱纯化获得足够量的可溶性 9R-GFP-PHD。离体结合实验证实,9R-GFP-PHD 保留了 PHD 与肌醇类 PIP2 和 IP3 的结合能力,且与两者间是竞争性结合。在细胞实验也发现通过蛋白导入法进入细胞的 9R-GFP-PHD 特异性分布在胞膜上,这与 PIP2 是细胞膜上磷脂成分有密切关系。在 ATP 刺激时,能通过 P2y 受体激活磷脂酶 C 以水解膜上的 PIP2。PIP2 水解成可溶性 IP3,研究表明 IP3 能促使 PHD 蛋白从细胞膜上解离。本实验也证实,9R-GFP-PHD 在 ATP 刺激后能从胞膜上解离。这些结果充分说明,9R-GFP-PHD 能有效地监测细胞膜上 PIP2 的动态变化。另外,IP3 与细胞内钙动员密切相关。故本研究将为今后研究细胞内钙动态变化提供新的实验工具蛋白。

参考文献:

- [1] Jost M, Simpson F, Kavran JM, et al. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation[J]. *Curr Biol*, 1998, 8(25):1399-1402.
- [2] Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, et al. Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes[J]. *Science*, 2001, 291(5506):1051-1055.
- [3] Lemmon MA, Ferguson KM, Schlessinger J. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface[J]. *Cell*, 1996, 85(5):621-624.
- [4] Lemmon MA, Ferguson KM, O'Brien R, et al. Specific and high-affinity binding of inositol phosphates to an isolated pleckstrin homology domain[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, 92(23):10472-10476.
- [5] Várnai P, Lin X, Lee SB, et al. Inositol lipid binding and

membrane localization of isolated pleckstrin homology (PH) domains. Studies on the PH domains of phospholipase C delta 1 and p130[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(30): 27412-27422.

- [6] Hirose K, Kadowaki S, Tanabe M, et al. Spatiotemporal dynamics of inositol 1,4,5-trisphosphate that underlies complex Ca²⁺ mobilization patterns[J]. *Science*, 1999, 284(5419):1527-1530.
- [7] Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, et al. A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation[J]. *J Neurosci*, 2001, 21(16):6000-6007.
- [8] Seregi A, Doll S, Schobert A, et al. Functionally diverse purinergic P2Y-receptors mediate prostanoid synthesis in cultured rat astrocytes: the role of ATP-induced phosphatidyl-inositol breakdown[J]. *Eicosanoids*, 1992, 5 Suppl: S19-22.
- [9] Green M, Loewenstein PM. Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein[J]. *Cell*, 1988, 55(6): 1179-1188.
- [10] Frankel AD, Pabo CO. cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus[J]. *Cell*, 1988, 55(6):1189-1193.
- [11] Inoue M, Tomizawa K, Matsushita M, et al. p53 protein transduction therapy: successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells[J]. *Eur Urol*, 2006, 49(1):161-168.
- [12] Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005, 57.
- [13] Snyder EL, Meade BR, Saenz C, et al. Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(2):186-193.

(收稿日期:2014-02-03 修回日期:2014-03-24)

(上接第 2304 页)

- [8] Binghui Li, Xiaofeng Ma, Yan W, et al. Structure-Activity relationship of polyphenols that inhibit fatty acid synthase [J]. *Journal of Biochemistry*, 2005, 138(6):679-685.
- [9] Bolden A, Bernard L, Jones D, et al. The PPAR Gamma agonist Troglitazone regulates Erk 1/2 phosphorylation via a PPARγ-independent MEK-dependent pathway in human prostate cancer cells[J]. *PPAR Res*, 2012; 2012: 929052.
- [10] Yokoyama Y, Xin B, Shigeto T, et al. Combination of ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, and cisplatin enhances the inhibition of growth

of human ovarian cancers[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011; 137(8):1219-1228.

- [11] Jackowski S, Wang J, Baburina I. Activity of the phosphatidylcholine biosynthetic pathway modulates the distribution of fatty acids into glycerolipids in proliferating cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1483(3):301-315.
- [12] Mantha AJ, McFee KE, Niknejad, et al. Epidermal growth factor receptor-targeted therapy potentiates lovastatin-induced apoptosis in head and neck carcinoma cells[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 26(2):350-353.

(收稿日期:2014-01-12 修回日期:2014-03-12)